

【総説】

第4回 金沢大学十全医学賞受賞論文

論文 「ミクログリアTREM2分子の機能解析と細胞治療への応用」
Functional analysis of microglial TREM2 and cell-mediated therapy by
TREM2 transduced myeloid precursors

高橋 和也 (たかはし かずや)

はじめに

近年、多発性硬化症などの炎症性疾患だけでなくアルツハイマー病などの神経変性疾患の病変形成に、活性化ミクログリアを中心とした炎症反応の関与が注目されている。ミクログリアによるさまざまな炎症性サイトカインの放出や抗原提示によるT細胞の活性化が神経変性を加速させ、細胞死した細胞の断片をミクログリアが貪食することによってさらに炎症反応を呼び込むという悪循環が変性過程を促進していくと考えられている。このような状況の中、遺伝性の神経変性疾患である那須-Hakola病の原因遺伝子としてTriggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)2/DAP12受容体遺伝子が同定された¹⁾。TREM2/DAP12受容体複合体は、ミエロイド系の細胞に発現している活性化受容体であり、変性疾患における免疫反応を理解する上で重要な手がかりになると思われる。

那須-Hakola病

那須-Hakola病は常染色体劣性遺伝形式をとり、polycystic lipomembranous osteoplasia with sclerosing leukoencephalopathy (PLOS)とも呼ばれている。若年から壮年期にかけて発症する皮質下の認知症と長管骨の易骨折性を主症状とする。1970年代に初めて報告されて以来、日本、フィンランドを中心にイタリア、アメリカなどからの報告も含め約200症例が記載されている。典型例は20代で手関節、足関節の骨嚢胞形成に由来する腫脹や痛みで発症し、同部位の易骨折性により骨異常に気付かれる。30代に入るとさまざまな精神神経学的症状が出現し、けいれん、失認、失行、記憶障害、性格障害などが進行する。徐々に社会適応性を喪失し、寝たきりとなり感染症などで亡くなることが多い。脳病理は前頭葉中心のグリオシスを伴った神経線維とミエリンの喪失を特徴とする。2000年にPalonevaらが那須-Hakola病の遺伝子異常は19染色体に位置するDAP12遺伝子にあると報告²⁾、さらに2年後、DAP12遺伝子異常を有しない那須-Hakola病患者はDAP12の会合蛋白であるTREM2遺伝子の異常を有していることを発表し³⁾、那須-Hakola病の原因はTREM2/DAP12シグナル伝達の欠損であることが解明された。

TREM2/DAP12シグナル伝達系

TREM2は約40 kDaの糖タンパクで、ミエロイド系の細胞に発現している。そのリガンドは不明であるが、さまざまな細菌構成成分やアストロサイトマのような腫瘍成分など陰性電荷を持っているものを認識することが報告されている⁴⁾。TREM2

は細胞内領域が短く、シグナル伝達部位を欠いているかわりに、その細胞膜内領域に塩基性アミノ酸であるリジンを含んでおり、このリジンにより、DAP12分子の酸性アミノ酸であるアスパラギン酸と電気的に会合している。DAP12を介して活性化シグナルは伝達される。

DAP12は免疫担当細胞であるナチュラルキラー細胞、ミエロイド系細胞に発現している12 kDaのアダプター分子であり、その細胞内領域にimmunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAMモチーフ)を有している。TREM2とリガンドの結合によりITAM内のチロシンがリン酸化され、続いてSyk, ZAP70をリン酸化する。その後下位のアダプター分子が活性化、細胞内Ca濃度を増加させることで細胞が活性化される⁵⁾。

那須-Hakola病とミクログリア

ミクログリアは中枢神経系の免疫担当細胞であり、その起源は骨髄ミエロイド系細胞と考えられている。またミクログリアは実際にTREM2/DAP12を発現している。ヒトでは前頭葉に比較的多くミクログリアが存在することは、那須-Hakola病の病変が前頭葉優位であることと合致する。これらのことはミクログリアの機能不全が那須-Hakola病の脳病変形成に重要な役割をもつことを想像させる。しかし一方で、那須-Hakola病患者の脳病理組織において、他の神経変性疾患同様、活性化ミクログリアを中心とした炎症病変が認められることは、活性化シグナルの欠損したミクログリアが活性化し、病変を形成するという一見矛盾したような状態が生じていることを意味する。

ミクログリアTREM2/DAP12機能の仮説モデル

ミクログリア以外にTREM2/DAP12を発現する細胞として破骨細胞と未成熟樹状細胞が知られている。ノックアウトマウスやヒト患者の研究から、TREM2/DAP12が欠損すると破骨細胞は細胞融合が障害され成熟型の破骨細胞に分化できないことが報告されている⁶⁾。このことからTREM2/DAP12は細胞膜の融合に関係していることが推測される。

ミクログリアの生理的な機能として、死細胞の貪食、各種炎症性サイトカインの産生、抗原提示能が知られている。これらのうちで膜の融合に関係していると考えられるのは死細胞の貪食である。那須-Hakola病の病変で「活性化シグナルの欠損したミクログリアが活性化している」ということは、生理的に重要な活性化シグナル伝達が障害されているため、非生理的シグナル伝達系が代償的に活性化しており、その活性化が病変形成に関与していると仮定することができる。

以上のことから我々はミクログリアTREM2/DAP12シグナル伝達系は生理的な死細胞の食食に関係しており、那須-Hakola病ではその活性化が障害されており、代償的に他のシグナル伝達系が活性化、その活性化が病態生理的に重要であると仮定した(図1)。

レンチウイルスによる遺伝子導入

上記仮説を証明するために我々は、マウスミクログリアのTREM2を刺激、もしくは欠損させることで、ミクログリアの食食、サイトカイン産生、抗原提示能がどのように変化するかを調べた⁹⁾。TREM2のリガンドは未だ不明であり、その刺激実験のため我々は、FLAGエピトープをもつTREM2分子をマウスミクログリアに遺伝子導入し、抗FLAG抗体のクロスリンクによって細胞を刺激する実験系を用いた。またTREM2の機能喪失実験のためRNA干渉を利用した。RNA干渉はショートヘアピン構造を持つTREM2遺伝子に特異的な配列を遺伝子導入することで作成した。いずれの実験も遺伝子導入にはレンチウイルスを使用した。通常のレトロウイルスでは多くても数%の導入効率であるのに対し、レンチウイルスの使用により遺伝子導入効率は90%以上になった⁹⁾。

TREM2刺激によるミクログリアの食食亢進

抗FLAG抗体によって、FLAGエピトープをもつTREM2分子またはコントロール遺伝子を遺伝子導入されたマウスミクログリアを刺激した。その結果、ラテックスビーズの食食はFLAGでタグ付けされたTREM2遺伝子を導入されたミクログリア群で著明に亢進した(図2)⁹⁾。しかしMHC classII分子を中心とする抗原提示に関与する分子の発現量に変化はなく、ミクログリアのサイトカイン産生能も変化はなかった(図3)⁹⁾。ミクログリアの生理的な死細胞の食食ではサイトカインの産生や抗原提示能の亢進は認められておらず、上記の結果はTREM2分子はミクログリアの生理的食食を活性化するという仮説に矛盾しないものであった。

TREM2による死細胞の除去

次に実際の細胞死に陥った神経細胞の食食を検討するため、正常TREM2分子の過剰発現、RNA干渉による発現抑制モデルを使用して、食食能を検討した。その結果、死細胞の食食はTREM2を過剰発現すると増加し、TREM2発現を抑制すると著しく抑制された(図4)⁹⁾。また興味深いことにミクログリアのTNF α やNOS2など炎症性サイトカインやメディエーター産生はTREM2を過剰発現すると減少し、TREM2発現を抑制すると増加した⁹⁾。以上の結果はさらに「ミクログリアTREM2/DAP12シグナル伝達系は生理的な死細胞の食食に関係しており、那須-Hakola病ではその活性化が障害されており、代償的に他のシグナル伝達系が活性化し炎症を惹起する」という我々の仮説を支持した。

TREM2分子による細胞治療の応用

近年アルツハイマー病患者の脳病変を調べた結果、古い脳梗塞病巣の周囲ではアミロイドベータの沈着が著しく減少していたということが報告された⁹⁾。これは脳梗塞によって細胞死した細胞をミクログリアが食食したとき、アミロイドベータ蛋白を同時に食食したことを意味する。そこで我々は、病変部位に

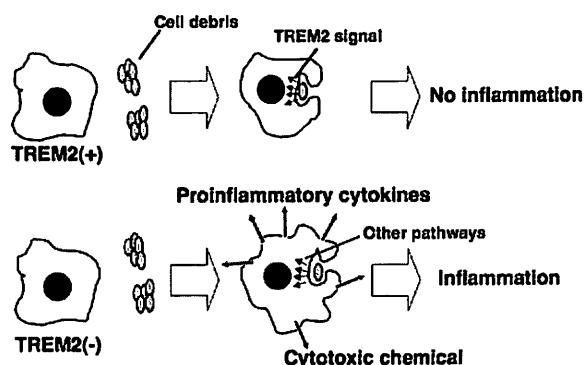


図1. ミクログリアTREM2/DAP12機能の仮説。TREM2陽性のミクログリアは死細胞断片を、TREM2レセプターを介して生理的食食するため、炎症反応を惹起しない(上図)。一方、TREM2シグナルの欠損したミクログリアは死細胞断片の食食を他のレセプターを介して行うため、炎症反応を惹起してしまう(下図)。

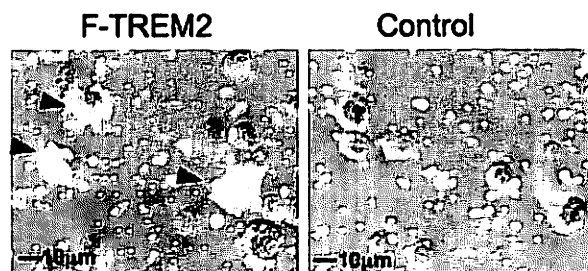


図2. TREM2刺激によるミクログリア食食の亢進。FLAGでタグ付けされたTREM2分子を遺伝子導入されたミクログリアを抗FLAG抗体でクロスリンク刺激するとラテックスビーズの食食が亢進する(F-TREM2)。矢頭は食食の亢進したミクログリア。コントロールの遺伝子を導入したミクログリアは食食の増加を認めない(Control)。(文献8より改変)

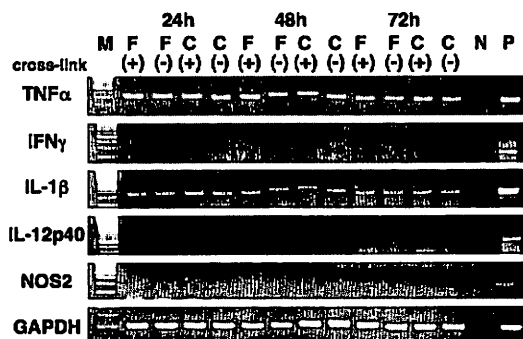


図3. TREM2刺激でミクログリアのサイトカイン産生は変化しない。FLAGでタグ付けされたTREM2分子を遺伝子導入したミクログリア(F)またはコントロール遺伝子を導入したミクログリア(C)を抗FLAG抗体でクロスリンク刺激したのち、24時間、48時間、72時間でミクログリアからmRNAを分離、RT-PCR法でTNF α 、IFN γ 、IL-1 β 、IL-12p70とNOS2の産生を比較した。GAPDHは内因性コントロールとして使用。Mはマーカー、Nは陰性コントロール、Pは陽性コントロール、(+)は刺激あり、(-)は刺激なしを表す。(文献8より改変)

TREM2を発現する細胞を増加させることは非炎症性食食を誘導し、炎症の負の循環を抑えられるのではないかと仮説を立て、細胞治療の分野で主要な標的細胞である骨髄細胞にTREM2を強制発現、実験的自己免疫性脳脊髄炎の治療効果を判定することを行った。

細胞治療を行うにあたって、将来実際に治療をする場合比較の容易に採取でき、TREM2発現が容易であると考えられる主要系列抗原陰性骨髄細胞を使用した。さらに骨髄細胞をGM-CSFを用いて骨髄由来単球様細胞に分化誘導した。単球はあらゆる組織の組織特異的マクロファージ(中枢神経系ではミクログリア)として常在できるため、血液脳関門も通過できうる細胞であり、かつミエロイド系の細胞であるため治療に適していると思われたためである。しかし骨髄から誘導した骨髄由来単球様細胞は通常状態でTREM2を発現していなかった。そのため我々は再びレンチウイルスを用いて、骨髄由来単球様細胞に

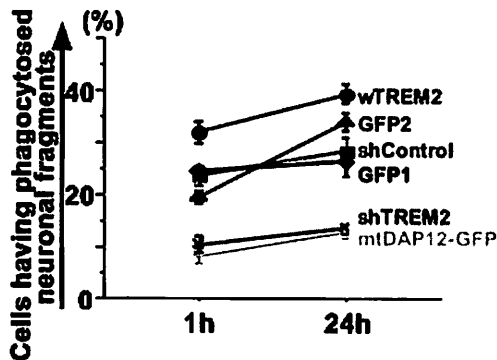


図4. TREM2発現量の違いが死細胞の貪食能を決定する。細胞死した神経細胞断片を蛍光色素で標識し、ミクログリアとともに培養した。培養後1時間と24時間でフローサイトメーターによって、死細胞を貪食しているミクログリアの割合を検討した。wTREM2はTREM2を過剰発現したミクログリア、shTREM2はRNA干渉によってTREM2発現が抑制されたミクログリア、mtDAP12-GFPは変異型のDAP12分子が過剰発現しているためTREM2シグナル伝達が抑制されている細胞、GFP1、GFP2、shControlは各コントロールベクターを遺伝子導入されたミクログリアを表す。(文献8より改変)

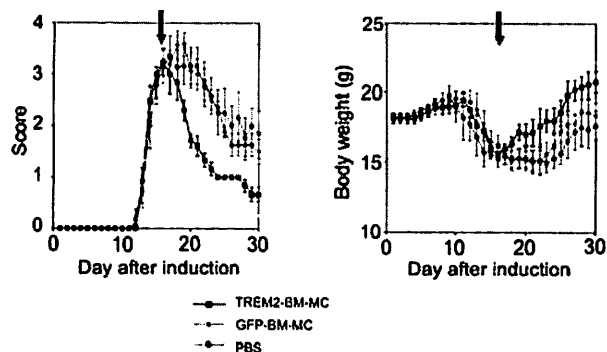


図5. TREM2陽性ミエロイド細胞によるEAEの細胞治療。実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症4日後にTREM2を遺伝子導入したミエロイド細胞(■)、コントロールとしてGFPを遺伝子導入されたミエロイド細胞(◆)はリン酸緩衝液(●)を経静脈的に投与した。TREM2を遺伝子導入したミエロイド細胞による治療はEAEの回復を早めた(左図)。また同時に体重の回復も早めた(右図)。

TREM2を遺伝子導入した。

TREM2遺伝子導入した骨髄由来単球様細胞は、TREM2刺激によりミクログリア同様貪食能が亢進し、さらにその貪食には抗原提示や炎症性サイトカインの産生を伴わなかった¹⁰⁾。またTREM2遺伝子導入した骨髄由来単球様細胞を実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスに経静脈的に投与すると病変部位に集まることを確認した¹⁰⁾。

上記のことを確認した後、TREM2遺伝子導入した骨髄由来単球様細胞を実験的自己免疫性脳脊髄炎発症期のマウスに静脈内投与した。その結果TREM2発現骨髄細胞投与群はコントロール群と比較して有意にその症状が改善した¹⁰⁾。しかし興味深いことに実験的自己免疫性脳脊髄炎発症初期や発症前に投与されても症状の改善はみられなかった。これらの結果は、TREM2を発現する細胞投与は非炎症性食食を誘導し炎症の負の循環を抑えるのではないかと仮説を指示した。また治療前後で脊髄を取り出しその病変を検索し、病変部位での貪食の亢進、炎症性サイトカインの産生低下を確認し、我々の仮説を確認した。

ま と め

TREM2分子のミクログリアでの機能を解析し、那須-Hakola病の脳病変における病態生理を解明した。さらにはTREM2が正常脳内におけるホメオスターシス維持に必須の死細胞の除去に関する重要なレセプターである可能性を示した。また、TREM2分子を用いた細胞治療の可能性を示した。今後遺伝子導入なしでTREM2分子の発現を誘導、細胞治療への応用に向けて研究を続けたい。

謝 辞

第4回金沢大学十全医学会賞受賞にあたり、本賞の運営に関わっておられます皆様に厚く御礼申し上げます。また、この研究を行うに当たって指導していただいたボン大学のノイマン教授をはじめ、有意義な議論を交わした共同研究者、マイスター級の技術で実験を手伝ってくれた実験助手の方々、そして何より慣れない海外と一緒に渡航し、いつも私を励まし快適な研究生活を送らせてくれた妻美栄、はな、このみ、妊娠中にも関わらず長時間の飛行機移動などにも耐え元気に生まれてくれた大樹にこの場を借りて深謝いたします。

文 献

- 1) Paloneva J, Kestila M, Wu J, et al. Loss-of-function mutations in TYROBP (DAP12) result in a presenile dementia with bone cysts. *Nat Genet* 25: 357-361, 2000
- 2) Kondo T, Takahashi K, Kohara N, et al. Heterogeneity of presenile dementia with bone cysts (Nasu-Hakola disease) Three genetic forms. *Neurology* 59: 1105-1107, 2002
- 3) Paloneva J, Manninen G, Chrstman K, et al. Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am J Hum Genet* 71: 656-662, 2002
- 4) Daws MR, Sullam PM, Niemi EC, et al. Pattern recognition by TREM-2: binding of anionic ligands. *J Immunol* 171: 594-599, 2003
- 5) Neumann H, Takahashi K. Essential role of the microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) for

central nervous tissue immune homeostasis. J Neuroimmunol 184: 92-99, 2007

6) Cella M, Buosanti C, Strader C, et al. Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals. J Exp Med 198: 645-651, 2003

7) Paloneva J, Mandelin J, Kiialainen A, et al. DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. J Exp Med 198: 669-675, 2003

8) Takahashi K, Christian DPR, Neumann H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering

receptor expressed on myeloid cells-2. J Exp Med 201: 647-657, 2005

9) Akiyama H, McGeer PL. Specificity of mechanisms for plaque removal after As immunotherapy for Alzheimer disease. Nat Med 10: 117-118, 2004

10) Takahashi K, Prinz M, Stagi M, et al. TREM2-transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis. PLoS Med 4: 675-689, 2007



Profile

平成6年3月金沢大学医学部卒業

平成6年4月京都大学神経内科学教室に入局，その後天理よろづ相談所病院，国立精神・神経センターで臨床，多発性硬化症に関する研究を続け平成15年1月京都大学医学博士授与

平成14年11月からEuropean Neuroscience Institute Göttingen, Bonn universityに留学

平成17年10月から金沢大学神経内科医員，平成18年4月から助手，現在に至る。

趣味：釣り，旅行

現在興味のあること：多発性硬化症の病態に関するミクログリアの役割や予防介入，再生医療の可能性について研究を続けたい。